取扱説明書

Repro Stem

Cat.# RCHEMD005

保存方法

本品は冷凍状態で発送されます。到着後すみやかに-20℃で保存して下さい。使用前に解凍し、解凍後は 2～8℃で保存して下さい。解凍後は 2 週間を目安に使い切って下さい。なるべく凍結融解は繰り返さないで下さい。

特長

・ヒト iPS 細胞(Takahashi, K., et al., *Cell*, 131, 861-72, 2007)でロット試験済みです。
・浸透圧、pH、滅菌、マイコプラズマ検査済みです
・希釈せずに使用できますので、試薬調整の手間が省けます
・血清は不含です
　2-Mercaptoethanol を含みます。

製品について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。また、本品を当社からの許可なしに第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

使用方法

Repro Stem を用いたヒト ES/iPS 細胞の継代方法

継代方法 （試薬類はあらかじめ室温に戻してご使用下さい。）
準備するもの(以下の試薬用量は、60 mm ディッシュの場合です。)
・本品：Repro Stem に 5ng/mL bFGF(RCHEOT002, 003)を添加したもの(以下、これらを「Repro Stem」と総称する)。ヒト ES/iPS 細胞の培養にはbFGF の添加が必要です。濃度は細胞株によって異なる場合がございます。
・Dissociation Solution for human ES/iPS Cells(以下、これを「剥離液」と総称する)
・フィーダー細胞を播種した 60mm 細胞培養ディッシュ
・PBS (-)：Ca^{++},Mg^{++}-free PBS
・その他培養操作に通常必要なもの

1、あらかじめ準備しておいたフィーダー細胞ディッシュからフィーダー細胞用培地を取り除き、新しい Repro Stem を 4 mL 加えておきます。
2、継代可能な状態のヒト ES/iPS 細胞のディッシュから Repro Stem を取り除き、PBS(-) 2mL で細胞を洗います。
3、剥離液をディッシュに 1 mL 加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃、CO_2 インキュベーターで 5 分程加温します。加温時間はご使用の細胞株、細胞の状態、フィーダー細胞の種類によって異なる場合があります。
4、細胞の状態を顕微鏡で観察し、半分以上のコロニーがフィーダー細胞から剥がれかけている状態になっている事を確認します。加温時間は調整して下さい。
5、新しい Repro Stem を 2～3 mL 加え、ES/iPS 細胞とフィーダー細胞を全て剥がし 15 mL チューブに回収します。注 1)
6、約 170×g (1,000 rpm)、5 分間、室温で遠心し、上清をできるだけ除きます。
7、沈殿した細胞に新しい Repro Stem を 1mL 加え、p-1000 ピペットマンのチップの先端をチューブの底部に軽く押し当て、細胞の塊をゆっくりとピペッティングし、コロニーの大きさを 100～200μm 程度に崩します。注 2)
8、懸濁した液の約 1/3～1/4 を、操作 1 で準備した新しいフィーダー細胞上にまき、細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、37℃、CO_2 インキュベーターで一晩培養します。継代の希釈割合は、ご使用の細胞株の増殖速度等によって異なります。注 3)
翌日から毎日 1 回、Repro Stem の交換を行って下さい。

ご注意）
1） 細胞は基本的に ES/iPS 細胞とフィーダー細胞がともに剥がれます。
2） 部分的に ES/iPS 細胞のコロニーがフィーダー細胞の塊に取り込まれる場合があります。その場合は無理にピペッティングせず、その塊を取り除いて、残りの ES/iPS 細胞コロニーで継代を行って下さい。
3） 継代時は古いフィーダー細胞も持ち越されます。フィーダー細胞を持ち越したくない場合は、細胞を懸濁後 5～10 分程静置して下さい。ES/iPS 細胞のコロニーが先に沈み、上清には細かくなったフィーダー細胞が残っているので、これを取り除くことで古いフィーダー細胞の大部分を取り除くことができます。

使用上のご注意

1、本製品は、iPS 細胞（201B7：K.Takahashi, M.Ohnuki, M.Narita, T.Ichisaka, K.Tomoda, and S.Yamanaka, Cell 131, 1-12, 2007）での培養実績がございますが、全ての ES/iPS 細胞株での培養を保証するものではありません。
2、弊社製品の Primate ES Cell Medium(RCHEMD001)から本製品に移行後、細胞状態の悪いコロニーが認められる場合もありますが、通常、数継代で安定します。
（4～5 継代後も細胞の状態が安定しない場合は、培地が合わない可能性がございます。）

関連製品

RCHEMD001	Primate ES Cell Medium
RCHEMD003, 004	ReproFF
RCHETP002	Dissociation Solution for human ES/iPS Cells
RCHEFM001	Freezing Medium for human ES/iPS Cells
RCHEOT001	ReproCoat
RCHEOT002, 003	bFGF
RCHEOT004	Lamimin-5
RCHEFC001	Feeder Cells (SL10)
RCHEFC003	Feeder Cells (MEF)

本製品の試験成績表は下記 URL よりご覧下さい。

株式会社リプロセル
http://www.reprocell.com
E-mail: info_jp@reprocell.com